

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-045604

(43)Date of publication of application : 17.02.1998

(51)Int.Cl.

A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 31/70
A61K 35/78
A61K 35/78
C07H 7/04

(21)Application number : 08-216663

(22)Date of filing : 30.07.1996

(71)Applicant : KUREHA CHEM IND CO LTD

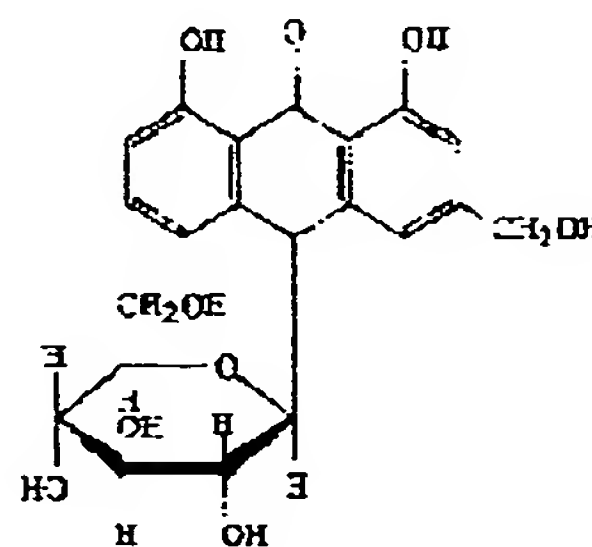
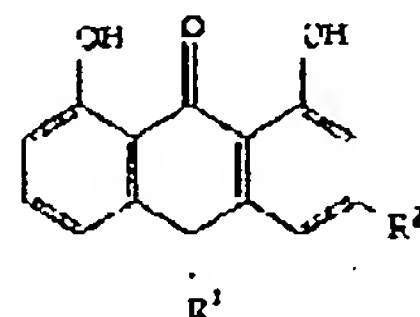
(72)Inventor : SHOBU YOICHI
TSUZUKI TOMOKO
SHIRAGAMI TOSHIMI
MORINO MASAYOSHI
YOSHIKUMI CHIKAO

(54) INHIBITOR OF SYNTHESIS OF HSP47 INCLUDING ALOIN DERIVATIVE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an inhibitor of a synthesis of HSP47 (heat shock protein) including an aloin derivative capable of specifically inhibiting the synthesis of the heat shock protein in a tissue cell in a morbid state having 47k dalton molecular weight and useful for a treatment for hepatocirrhosis, etc., by including the aloin derivative which is an ingredient of an aloe as an active ingredient.

SOLUTION: This inhibitor of a synthesis of HSP47 includes an aloin derivative of formula I (R1 is a hexose residue obtained by removing a hydroxy group at 1-position of the hexose; R2 is a 1-3C hydroxyalkyl), e.g. the aloin of formula II [10-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9(10H)-anthracene] as an active ingredient. Moreover, the aloin derivative is obtained by extracting it from an aloe (*Aloe ferox* Miller, etc.) with water or an organic solvent such as methyl alcohol at a temperature of the boiling temperature or less for 10min to 60hr by a means of heating and refluxing, etc.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-45604

(43)公開日 平成10年(1998)2月17日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	A E D		A 6 1 K 31/70	A E D
	A B N			A B N
	A B X			A B X
	A C D			A C D
	A C S			A C S
審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平8-216663	(71)出願人	000001100 呉羽化学工業株式会社 東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号
(22)出願日	平成8年(1996)7月30日	(72)発明者	清輔 洋一 東京都新宿区百人町3-26-1-303
		(72)発明者	都築 智子 埼玉県蕨市北町4-8-26-106
		(72)発明者	白神 俊美 東京都小平市大沼町1-180-1-306
		(72)発明者	森野 眞嘉 東京都練馬区光が丘3-7-2-207
		(72)発明者	吉汲 親雄 東京都国立市東2-19-46
		(74)代理人	弁理士 森田 憲一

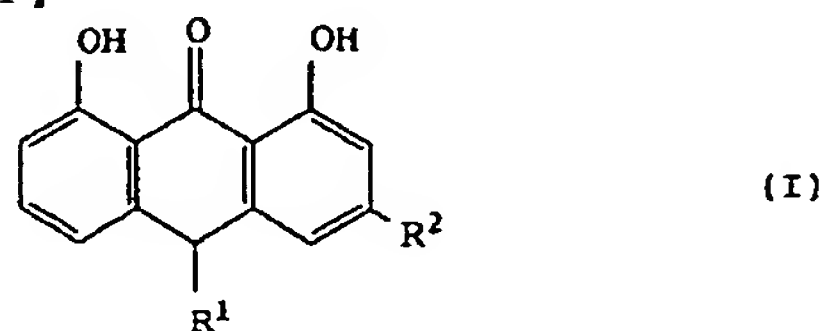
(54)【発明の名称】 アロイン誘導体含有HSP47合成抑制剤

(57)【要約】

【課題】 コラーゲン合成を抑制することによって、細胞外マトリックス産生の亢進の病態を示す病気を治療することができる、分子量47キログルトンの熱ショックタンパク質の合成抑制剤を提供する。

【解決手段】 下記一般式(1)で表されるアロイン誘導体を有効成分として含有する。

【化1】

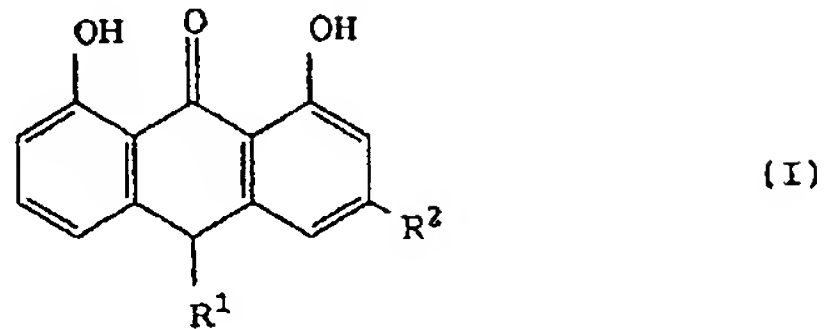


(式中、R¹ は、ヘキソースの1位の水酸基を除いたヘキソース残基、R² は、炭素数1~3のヒドロキシアルキル基)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式 (I) :

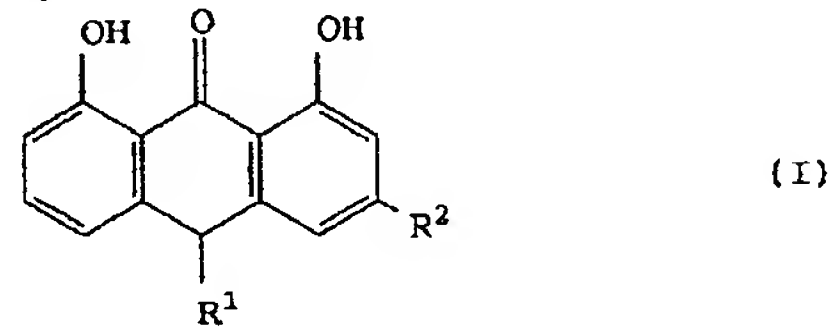
【化 1】



(式中、 R^1 は、ヘキソースの 1 位の水酸基を除いたヘキソース残基であり、 R^2 は、炭素数 1~3 のヒドロキシアルキル基である) で表されるアロイン誘導体を有効成分として含有することを特徴とする、分子量 47 キロダルトンの熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項 2】 式 (I) :

【化 2】



(式中、 R^1 は、ヘキソースの 1 位の水酸基を除いたヘキソース残基であり、 R^2 は、炭素数 1~3 のヒドロキシアルキル基である) で表されるアロイン誘導体を含有する植物の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする、分子量 47 キロダルトンの熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項 3】 アロエの抽出物を有効成分として含有することを特徴とする、分子量 47 キロダルトンの熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アロイン誘導体を有効成分として含有する、分子量が 47 キロダルトン (kD) の熱ショックタンパク質 (以下、HSP47 と称する) の合成抑制剤に関する。本発明の HSP47 合成抑制剤は、特に、臓器内のコラーゲンの合成を抑制することにより肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全 (又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス (細胞外基質) 産生亢進の病態を示す病気の患者の生理学的状態を有効に改善させ、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全 (又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス産生亢進の病態を示す病気を効果的に治療することができる。

【0002】

【従来の技術】近年、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生の亢進の病態を示す病気が大きな問題となっている。ここでいう細胞外マトリックス産生の亢進の病態を示す病気とは、例えば肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全 (又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどを含む。

【0003】例えば、死亡者がわが国だけでも年間約 2 万人にもものぼるといわれている肝硬変は、肝臓が結合組織の増殖のため固くなる病気の総称で、種々の慢性肝疾患の終末像であるといわれ、肝全体にわたるびまん性の肝線維症である。すなわち、炎症などの肝傷害が長期に及ぶ慢性肝炎においては、線維芽細胞や伊東細胞などの細胞外マトリックス (特に I 型コラーゲン) 産生の著しい亢進を伴い肝臓は線維化する。肝の線維化が慢性的に進行すると、ますます正常な肝再生は妨害され、肝細胞に置き換わり、線維芽細胞と I 型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックスが肝組織のかなりの部分を占め、多くの凝小葉からなる肝硬変に至る。肝硬変の進行に伴い、線維隔壁が肝全体に進展し、その結果生じる血流の異常は、肝実質細胞の変性を更に押し進める一因にもなり、肝硬変における悪循環が続くことになり、更にはアルコール、ウイルス、自己免疫等種々の原因によって、肝臓中に多量の膠質線維が生成され、肝細胞の壊死と機能消失とが生じ、肝硬変患者は遂には死に至る。I 型コラーゲンは正常肝では全タンパク質量の約 2% を占めるが、肝硬変となると 10~30% を占めるようになる。

【0004】また、間質性肺疾患は、肺胞及び肺胞管のみならず、しばしば呼吸細気管支や終末気管支も巻き込む下部気道の慢性炎症 (肺胞炎 alveolitis) とその結果である間質の線維化と肺胞内線維化を特徴とする疾患群である。ここでいう間質性肺疾患とは、例えば、間質性肺炎、肺線維症などのびまん性間質性肺疾患、特発性肺線維症、透過性肺水腫、膠原病肺、サルコイドーシスなどを含む。間質性肺疾患においては、線維化組織では細胞外マトリックスの過剰な産生と蓄積が認められている。すなわち、間質性肺疾患の肺線維化組織では、肥大した間質に著明な I 型及び III 型コラーゲンの集積がみられており、特に III 型コラーゲンは、線維化の早期に肥厚した肺胞中隔に集積し、病期が進行し、後期には I 型コラーゲンが増加し、主要なコラーゲンとなる。基底膜は早期に破壊されており、肺胞腔側へのコラーゲン線維の侵入が観察される。

【0005】また、慢性腎不全とは慢性腎炎症候群の結果、腎機能の荒廃により体内の恒常性が維持できなくなった状態である。慢性腎不全の進行を病理学的にみると糸球体硬化と間質線維化の進行である。糸球体硬化症は、メサンギウム領域を中心とした細胞外マトリックスの増生である。メサンギウム硬化症の成分は正常と比較

し、著明にIV型コラーゲンなどの糸球体基底膜の成分が増加し、また間質成分であるI型コラーゲンも硬化症部位に一致して増生している。すなわち、慢性に経過する糸球体硬化に対しては、細胞外マトリックスの産生亢進が大きな要因である。ここで慢性腎不全に陥る疾患とは、例えばIgA腎症、巣状糸球体硬化症、膜性増殖性腎炎、糖尿病性腎症、慢性間質性腎炎、慢性糸球体腎炎などを含む。

【0006】また、心筋細胞は高度に分化した細胞で、分裂して増殖する能力を持ち合わせていない。したがって、心臓に何らかの負荷が加わると、心筋細胞はその一つ一つが肥大して収縮力を増大させ、心機能を保とうとする。更に、負荷が長時間持続すると、虚血の要因を中心に多彩な障害が蓄積され、負荷に対する代償機構に破綻をきたし、心筋の収縮力は急激に低下し、心臓のポンプ機能は損なわれて、心不全に陥ることが知られており、心肥大は我が国における心不全の成因として最も大きな部分を占めている。また、心肥大の形成は、心不全発症の最大の危険因子になるばかりでなく、虚血性心疾患や重篤な心室性不整脈の合併率が有意に高くなり、生命予後を独立に規定する要因になっている。心肥大進展時には個々の心筋細胞が著しく肥大するだけでなく、その心筋細胞をしっかりと束ねるために、間質の線維化が促進され、細胞外マトリックスであるコラーゲンが増加する。また、心筋炎・心筋虚血などにより心筋細胞を失うと、コラーゲンが生合成され間隙を置換する。間質の線維化が過剰に進展すると、その結果、心筋は固くなり、拡張が障害される。更に、筋小体機能も低下して心筋の拡張期の弛緩も障害される。その他、術後の瘢痕や熱傷性瘢痕、あるいは強皮症、動脈硬化等の細胞外マトリックス産生亢進の病態を示す病気は、何らかの原因によりコラーゲン合成の異常亢進が起こり、線維化が進んで組織の硬化変化を生ずることが主要な成因と考えられている。

【0007】また、血管新生においても基底膜及び基底膜中のコラーゲン合成が、重要な役割をはたすことが指摘されている(Maragoudakis, E., Sarmonika, M., and Panoutsacopoulos, M., "J. Pharmacol. Exp. Ther.", 244: 729, 1988; Ingber, D. E., Madri, J. A., and Folkman, J., "Endocrinology", 119: 1768, 1986)。血管新生による疾患としては、例えば、糖尿病性網膜症、後水晶体線維増殖症、角膜移植に伴う血管新生、緑内障、眼腫瘍、トラコーマ、幹せん、化膿性肉芽腫、血管腫、線維性血管腫、肥大性はん痕、肉芽、リウマチ性関節炎、浮腫性硬化症、アテローム性動脈硬化症、各種腫瘍などが知られている。このようにコラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生の亢進の病態を示す病気が大きな問題となっているにもかかわらず、従来では副作用や薬理効果等の種々の面で満足すべき細胞外マトリックス合成抑制剤(例えば、コラーゲン合成抑制

剤)は未だ開発されていなかったのである。

【0008】一方、熱ショックタンパク質(heat shock protein; HSP、ストレスタンパク質ともいう)は、細胞を何らかのストレス、例えば熱、重金属、薬剤、アミノ酸類似体、又は低酸素(低濃度酸素)などで刺激することにより、細胞に発現される一群のタンパク質である。熱ショックタンパク質は、自然界に普遍的に存在しており、細菌、酵母、植物、昆虫、及びヒトを含む高等動物により産生される。HSPは、その種類は多種多様であるが、分子量の大きさからHSP90ファミリー(例えば、90kD又は110kDのHSPなど)、HSP70ファミリー(例えば、70~73kDのHSPなど)、HSP60ファミリー(例えば、57~68kDのHSPなど)、低分子HSPファミリー(例えば、20kD、25~28kD、又は47kDのHSPなど)の4ファミリーに大別することができる。なお、本明細書においては、特定分子量を有するHSPを、HSPとその直後に記載する数字とによって示すものとし、例えば、分子量47kDのHSPを『HSP47』と称するものとする。以上のように、HSPには多くの種類が存在するが、これらは分子量だけでなく、構造、機能、又は性質などもそれぞれ異なるものである。ストレスへの応答に加えて、これらのタンパク質の中には構造的に合成されるものがあり、正常な環境の下で、タンパク質のフォールディング、アンフォールディング、タンパク質サブユニットの会合、タンパク質の膜輸送のような、必須の生理的な役割を演じていることが示されている。熱ショックタンパク質としてのこれらの機能は、分子シャペロンと称される。

【0009】HSP47は、永田等によって1986年に発見されたタンパク質で、分子量47キロダルトンの塩基性タンパク質(pI=9.0)である。HSP47の発現が増大するにつれて、コラーゲンの合成も増加することが様々な細胞で示されている("J. Biol. Chem.", 261: 7531, 1986; "Eur. J. Biochem.", 206: 323, 1992; "J. Biol. Chem.", 265: 992, 1990; "J. Clin. Invest.", 94: 2481, 1994)。すなわち、HSP47は、細胞内で小胞体内でのプロコラーゲンのプロセッシング、三重鎖ヘリックス形成、あるいは小胞体からゴルジ装置へのプロコラーゲン輸送・分泌という局面で、コラーゲンの特異的分子シャペロンとして機能しているとされているので、増大したHSP47発現は、細胞外マトリックスにおけるコラーゲン分子の蓄積を刺激する。このようにコラーゲン結合熱ショックタンパク質であるHSP47は、発現と同様に機能においても、細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲンに密接に関連した熱ショックタンパク質である。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記事情に鑑み、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全(又は慢

性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス産生亢進の病態を示す病気の患者の生理学的状態を有効に改善させ、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全(又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス産生亢進の病態を示す病気を効果的に治療することのできる、細胞外マトリックス合成抑制剤を提供するために、種々検討を重ねてきた。

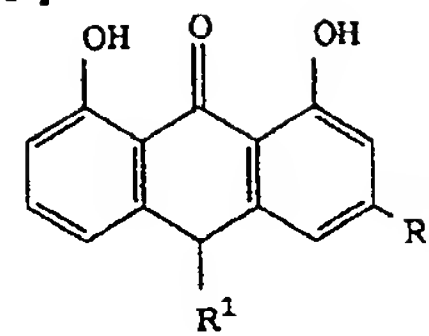
【0011】上記したように、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全(又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの線維症は臓器内の細胞外マトリックスの著しく増加した病態が主病変と理解されている。肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全(又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス産生亢進の病態を示す病気に伴う線維化は、コラーゲン合成増加やコラーゲン分解能の低下により生ずると考えられている。例えば、肝の線維化において、I型、III型、IV型コラーゲンの合成活性化が起こるが、特に主要成分であるI型コラーゲンの合成活性化が重要な意味をもつ。

【0012】こうした状況下で、本発明者らは、意外にも、アロエの成分であるアロイン、又はその誘導体が、病態を示す組織の細胞におけるHSP47の合成を特異的に抑制することを見出した。すなわち、アロイン誘導体を投与することにより、細胞内でのHSP47の合成を抑制し、臓器内でのコラーゲン合成を抑制し、ひいては肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全(又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス産生亢進の病態を示す病気の治療が可能であることを見出したのである。本発明はこうした知見に基づくものであり、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全(又は慢性腎不全に陥る疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス産生の亢進の病態を示す病気を効果的に治療することのできるHSP47合成抑制剤であって、細胞内でのコラーゲンの成熟及び輸送過程に重要な役割を果たしているコラーゲン特異的な分子シャペロンであるHSP47の合成抑制剤を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、式(I)：

【化3】



(I)

(式中、R¹ は、ヘキソースの1位の水酸基を除いたヘキソース残基であり、R² は、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基である)で表されるアロイン誘導体を有効成分として含有することを特徴とする、分子量47キログルトンの熱ショックタンパク質の合成抑制剤に関する。

【0014】

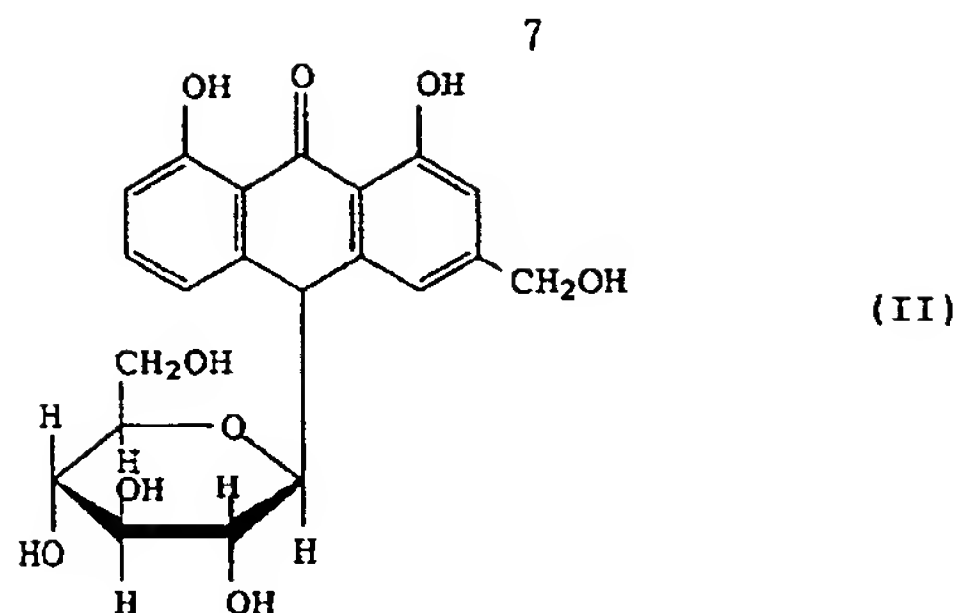
【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明の合成抑制剤は、有効成分として前記式(I)で表されるアロイン誘導体を含有する。本明細書においてヘキソース残基とは、ヘキソースの1位の水酸基を除いた残基である。前記ヘキソースとしては、例えば、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、ブシコース、フルクトース、ソルボース、又はタガトースなどを挙げることができる。ヘキソースは、D-体又はL-体のいずれであってもよく、また、ピラノース型又はフラノース型のいずれであってもよい。好ましいヘキソースは、グルコースである。前記ヘキソース残基とアントラセノン部分との結合は、グリコシド結合である。グリコシド1位の立体配置は、 α -アノマー又は β -アノマーのいずれであってもよい。

【0015】本明細書において炭素数1～3のヒドロキシアルキル基とは、1又はそれ以上の水酸基で置換されている炭素数1～3のアルキル基、例えば、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシプロピル基、1-ヒドロキシプロピル基、又は2-ヒドロキシ-1-メチルエチル基などであり、ヒドロキシメチル基が好ましい。

【0016】前記式(I)で表されるアロイン誘導体には、立体異性体が存在し、それらの任意の純粋の立体異性体又はそれらの混合物を、本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることができる。

【0017】本発明の合成抑制剤において有効成分として使用することのできるアロイン誘導体としては、式(II)：

【化4】



で表されるアロイン [aloin; 10-グルコピラノシル-1, 8-ジヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)-9(10H)-アントラセノン] が好ましい。アロインは、例えば、アロエ等の生薬に含まれている。アロインには、立体異性体が存在し、アロインの任意の純粋の立体異性体又はそれらの混合物を、本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることができる。

【0018】本発明の合成抑制剤に含有されるアロイン誘導体は、化学合成によって、又は天然物から抽出して精製することによって、調製することができる。あるいは、市販品を用いてもよい。本発明の合成抑制剤において有効成分として用いるアロイン誘導体を、天然物から抽出する場合には、例えば、アロイン誘導体を含有する植物の全体又は一部分（例えば、全草、葉、根、根茎、茎、根皮、若しくは花）をそのまま用いて、又は簡単に加工処理（例えば、乾燥、切断、湯通し、蒸気加熱、若しくは粉末化）したもの（例えば、生薬）を用いて抽出する。抽出条件は一般的に植物抽出に用いられる条件ならば特に制限はない。アロインを含有する植物としては、これに限定するものではないが、例えば、アロエ・フェロックス・ミラー (Aloe ferox Miller) 、アロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・アフリカナ・ミラー (Aloe africana Miller) との雑種、又はアロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・スピカタ・ベイカー (Aloe spicata Baker) との雑種などを使用することができる。

【0019】本発明におけるアロインを生薬から抽出する場合、これに限定するものではないが、例えば、アロエから抽出することが好ましい。アロエ（ロカイ; Aloe）とは、アロエ・フェロックス・ミラー、アロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・アフリカナ・ミラーとの雑種、又はアロエ・フェロックス・ミラーとアロエ・スピカタ・ベイカーとの雑種などの葉から得た液汁を乾燥したものを意味し、それらの部分を単独であるいは任意に組み合わせて使用することができる。

【0020】本発明による合成抑制剤において有効成分として用いることのできるアロエ抽出物は、前記のアロインを含有していればよく、従って、アロエの粗抽出物を用いることができる。本発明で用いることのできるアロエ抽出物の製造方法としては、アロエを、水（例え

ば、冷水、温水、又は熱湯）によって抽出するか、又は有機溶媒を用いて抽出することによって、得ることができる。有機溶媒としては、例えば、炭素数1～6のアルコール（例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、若しくはブチルアルコール）、エステル（例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、若しくは酢酸ブチル）、ケトン（例えば、アセトン若しくはメチルイソブチルケトン）、エーテル、石油エーテル、n-ヘキサン、シクロヘキサン、トルエン、ベンゼン、炭化水素のハロゲン誘導体（例えば、四塩化炭素、ジクロロメタン、若しくはクロロホルム）、ピリジン、グリコール（例えば、プロピレングリコール、若しくはブチレングリコール）、ポリエチレングリコール、又はアセトニトリルなどを用いることができ、これらの有機溶媒を単独、又は適宜組み合わせ、一定の比率で混合し、更には無水又は含水状態で用いることができる。水抽出又は有機溶媒抽出の方法としては、通常の生薬抽出に用いられる方法を用いることができ、例えば、（乾燥）アロエ1重量部に対し、水又は有機溶媒3～300重量部を用いて、攪拌しながら、その沸点以下の温度で加熱還流、常温で超音波抽出、あるいは冷浸することが望ましい。抽出工程は、通常は5分～7日間、好ましくは10分～60時間実施し、必要に応じて、攪拌等の補助的手段を加えることにより、抽出時間を短縮することができる。

【0021】抽出工程終了後、濾過又は遠心分離等の適当な方法により、水又は有機溶媒抽出液から、不溶物を分離して粗抽出物を得ることができる。なお、本発明の合成抑制剤において、天然物より抽出、分画したアロインを用いる場合には、前記の粗抽出物を特に精製することなく、そのまま使用してもよい。常法による水抽出物又は有機溶媒抽出物の他に、前記の粗抽出物を各種有機溶媒又は吸着剤等により、更に処理した精製抽出物も、本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることができる。これらの粗抽出物及び各種の精製処理を終えた精製抽出物を含むアロエ抽出物は、抽出したままの溶液を用いても、溶媒を濃縮したエキスをを用いても良いし、溶媒を留去し乾燥した粉末、更には結晶化して精製したもの、あるいは粘性のある物質を用いても良く、またそれらの希釈液を用いることもできる。こうして得られたアロエ抽出物は、アロエに含まれるアロインを含み、同時に原料のアロエに由来する不純物を含んでいる。

【0022】本発明の合成抑制剤は、アロイン誘導体、又はアロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特に、アロエ抽出物）を、それ単独で、又は好ましくは製剤学的若しくは獣医学的に許容することのできる通常の担体と共に、動物、好ましくは哺乳動物（特にヒト）に投与することができる。投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸

濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。例えば、アロイン 1 重量部と乳糖 99 重量部とを混合して充填したカプセル剤などである。

【0023】非経口投与方法としては、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。例えば、注射剤の調製においては、有効成分としてのアロイン誘導体、又はアロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特には、アロエ抽出物）の他に、例えば、生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤などを任意に用いることができる。また、本発明の合成抑制剤は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の合成抑制剤をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植することができる。

【0024】本発明の合成抑制剤は、これに限定されるものではないが、アロイン誘導体を、0.01～99 重量%、好ましくは 0.1～80 重量%の量で含有することができる。また、アロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特には、アロエ抽出物）を有効成分として含有する本発明の合成抑制剤は、その中に含まれるアロイン誘導体が前記の量範囲になるように適宜調整して、調製することができる。なお、アロイン誘導体を含有する植物の抽出物、例えば、アロイン誘導体を含有する生薬の抽出物（特には、アロエ抽出物）を有効成分として含有する合成抑制剤を、経口投与用製剤とする場合には、製剤学的に許容することのできる担体を用いて、製剤化することが好ましい。本発明の合成抑制剤を用いる場合の投与量は、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などにより異なり、特に制限はないが、アロイン誘導体量として通常成人 1 人当り 1 mg～10 g 程度を、1 日 1～4 回程度にわけて、経口的に又

は非経口的に投与する。更に、用途も医薬品に限定されるものではなく、種々の用途、例えば、機能性食品や健康食品として飲食物の形で与えることも可能である。

【0025】

【作用】上記したように、本発明の合成抑制剤に含有されるアロイン誘導体は、細胞内の HSP 47 合成を特異的に抑制する作用があるので、前記アロイン誘導体を投与すると細胞内での HSP 47 生合成が特異的に減少し、コラーゲンの生合成が抑制される。その結果、細胞外マトリックス産生も抑制されることになる。従って、前記アロイン誘導体は、コラーゲンの増加を伴う細胞外マトリックス産生亢進の病態を示す病気、例えば肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全（又は慢性腎不全に陥いる疾患）、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの予防及び治療に使用することができる。すなわち、本発明の合成抑制剤は、コラーゲン特異的シャペロンである HSP 47 の合成を抑制することによりコラーゲンの合成を抑制する。

【0026】また、前記のように、血管新生においても、基底膜及び基底膜中のコラーゲン合成が重要な役割をはたすことが指摘されているので、本発明の合成抑制剤は、血管新生の異常増殖に基づく多くの疾患の予防治療薬として極めて有用であり、先に述べたような各疾患、すなわち糖尿病性網膜症、後水晶体線維増殖症、角膜移植に伴う血管新生、緑内障、眼腫瘍、トラコーマ、乾せん、化膿性肉芽腫、血管腫、線維性血管腫、肥大型はん痕、肉芽、リウマチ性関節炎、浮腫性硬化症、アテローム性動脈硬化症及び各種腫瘍などに用いることができる。更に、I 型コラーゲンとフィブロネクチンを基本骨格とする間質（interstitial stroma）が癌の転移において、離脱した癌細胞が近傍の脈管に侵入するまでのガイド役を果たすことが、明らかとなっているので〔“BIOTHERAPY”, 7 (8) : 1181, 1993〕、本発明の合成抑制剤を投与することにより、癌の転移を抑制することも可能である。

【0027】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1：抗 HSP 47 ポリクローナル抗体の作製

(1) 抗 HSP 47 ポリクローナル抗体の調製

ヒト HSP 47 の N 末端から 2～16 番目のアミノ酸配列に対応するアミノ酸 15 個からなるペプチド（以下、ヒト HSP 47 ペプチド（2-16）と称する）を自動ペプチド合成装置（PSSM-8 システム、島津製作所）を用いて作製し、スクシニミジル 4-（p-マレイミドフェニル）ブチレート〔SMPB : Succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate〕を架橋剤として用い、常法〔“Biochemistry”, 18 : 690, 1979〕によりラクトグ

ロブリンと結合させ、感作抗原を作製した。この感作抗原150 μ gを含むリン酸緩衝生理食塩水〔組成：KCl=0.2g/l, KH_2PO_4 =0.2g/l, NaCl=8g/l, Na_2HPO_4 （無水）=1.15g/l：以下PBS（-）と称する：コスモバイオ，カタログ番号320-01〕0.2mlと、等量のフロイント完全アジュバント（ヤトロン，カタログ番号RM606-1）とを混合し、得られた混合液0.2mlを、ルーラット（6週齢，雌性：日本クレア）の皮下に投与し、免疫した。同様の方法で第2次及び第3次免疫を繰り返した後、アジュバント（Hunter's TiterMax；CytRx Corporation，米国ジョージア州）を用いて6回免疫感作を行った。感作動物より採血し、常法により血清を分離して採取し、以下に示す酵素抗体法（ELISA法）及びウェスタンブロット法によって血清中の抗体価を測定した。

【0028】（2）酵素抗体法（ELISA法）による抗HSP47ポリクローナル抗体特性の評価

前項（1）で調製したヒトHSP47ペプチド（2-16）をPBS（-）に溶解し、10 μ g/mlの濃度のペプチド溶液を調製し、リジッタセイプレート（ファルコン，カタログ番号3910）の各ウェルに前記ペプチド溶液を50 μ lずつ滴下した。最も外側のウェルにはPBS（-）50 μ lのみを入れ、湿潤下で4℃にて一晩放置した後、前記ペプチド溶液を捨て、PBS（-）を用いて各ウェルを洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン（以下、BSAと略称する）を含むPBS（-）100 μ lを各ウェルに入れ、室温下で1時間放置した。PBS（-）で3回洗浄した後、前項（1）で取得したルーラット血清50 μ lを各ウェルに入れ、1時間室温にて放置した。PBS（-）で3回洗浄した後、各ウェルに2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG50 μ lを入れ、室温下で1時間放置した。PBS（-）で2回洗浄した後、過酸化水素水4 μ lを加えた0.1Mクエン酸バッファー（pH4.5）10mlにo-フェニレンジアミン（OPD）タブレット（シグマ，カタログ番号P8287）1個（10mg）を溶解して調製した基質液100 μ lずつを各ウェルに滴下し、室温にて遮光下で30分間放置した後、各ウェルの492nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（東ソー，MPR-A4i型）にて測定した。抗体価の上昇が確認された血清を抗ヒトHSP47ポリクローナル抗体として以下の実施例に用いた。

【0029】（3）ウェスタンブロット法による抗HSP47ポリクローナル抗体特性の評価

Laemmliのバッファー系（Laemmli, N. K., "Nature", 283: pp. 249-256, 1970）を用いて、HeLa細胞のライセートのドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動を、以下の方法に従って行った。濃縮ゲルの調製は次のように行った。蒸留水6.1ml、0.5Mトリス（バイオ・ラッド，カタク

グ番号161-0716）-HCl（pH6.8）2.5ml、10%SDS（バイオ・ラッド，カタログ番号161-0301）100 μ l、及び30%アクリルアミド（バイオ・ラッド，カタログ番号161-0101）/N,N'-メチレンビスアクリルアミド（バイオ・ラッド，カタログ番号161-0201）1.3mlを混合して、15分間脱気し、10%過硫酸アンモニウム（バイオ・ラッド，カタログ番号161-0700）50 μ l及びN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（以下、TEMEDと略称する）（バイオ・ラッド，カタログ番号161-0800）10 μ lを加えて、濃縮ゲルを調製した。また、分離ゲルの調製は次のように行った。蒸留水4.045ml、1.5Mトリス-HCl（pH8.8）2.5ml、10%SDS100 μ l、及び30%アクリルアミド/N,N'-メチレンビスアクリルアミド3.3mlをゆっくり混合して、15分間アスピレータで脱気し、10%過硫酸アンモニウム50 μ l、及びTEMED5 μ lを加えた。泳動バッファーとしては、トリス9.0g、グリシン（バイオ・ラッド，カタログ番号161-0717）43.2g、及びSDS3.0gに蒸留水を加えて600mlにし、これを蒸留水で5倍希釈したものをを用いた。サンプルバッファーは、蒸留水2ml、2Mトリス-HCl（pH6.8）500 μ l、SDS0.32g、 β -メルカプトエタノール800 μ l、及び0.05%（w/v）ブROMOFENOLBLUE（バイオ・ラッド，カタログ番号161-0404）400 μ lを混合したものをを用いた。

【0030】5%二酸化炭素条件下で、37℃で、10%非働化ウシ胎児血清（以下、FBSと略称する）を含むMEM培地中でHeLa細胞を培養し、そのライセートを調製した。得られたHeLa細胞ライセートのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、0.45 μ mニトロセルロース膜（Schleicher & Schuell，カタログ番号401196）にゲルを密着させ、タンパク質転写装置（Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell：バイオ・ラッド）を用いて、室温にて100Vで、3時間ブロッティングを行った。ブロッティングバッファーとしては0.025Mトリス及び0.192MグリシンよりなりpH8.5に調整されたトリスグリシンバッファー（Tris Gly Running and Blotting Buffer；Enprotech，米国マサチューセッツ州，カタログ番号SA100034）にメチルアルコールを20%になるように加えて調製したバッファーを用いた。ブロッティング後、5%スキムミルク（雪印乳業）を含むPBS（-）溶液にニトロセルロース膜を室温にて30分間浸し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、スクリーナーブロッター（サンブラテック）を用いて、前項（1）で取得したルーラット血清を1次抗体として、1次抗体反応を行った。1次抗体反応は、2%スキムミルク（雪印乳業）を含むPBS（-）にて10倍希釈した前記ルーラット血清200 μ lで、室温にて120分間行った。1次抗体反応終了

後、スロー・ロッキング・シェイカーを用いて、PBS (一) で5分間の振盪を2回、0.1% Tween 20 (バイオ・ラッド, カタログ番号170-6531) を含むPBS (一) 溶液で15分間の振盪を4回、更にPBS (一) で5分間の振盪を2回行うことにより、ニトロセルロース膜を洗浄した。洗浄終了後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットIgG抗体 (Southern Biotechnology, カタログ番号3030-05) を、2%スキムミルクを含むPBS (一) 溶液で5000倍に希釈した溶液5mlを用いて、2次抗体反応を2時間行った。反応終了後、PBS (一) 溶液、及び0.1% Tween 20を含むPBS (一) 溶液で、1次抗体反応後の洗浄と同じ条件下にてニトロセルロース膜の洗浄を行った。

【0031】余分なPBS (一) 溶液を除去した後、ウェスタンブロッティング検出試薬 (ECL Western blotting detection reagent; アマーシャム, カタログ番号RPN2106) をニトロセルロース膜上に振りかけ、1分間室温にて静置した後、余分な検出試薬を除去し、ニトロセルロース膜をラップに包み、反応面をX線フィルム (コダック X-OMAT, AR, カタログ番号165 1454) に密着させて露光させた。現像後、HSP 47に相当する分子量47キロダルトン付近のバンドを測定することによって、抗HSP 47ポリクローナル抗体の反応性の検討を行った。抗体価の上昇が確認された血清を、抗ヒトHSP 47ポリクローナル抗体として、以下の実施例に用いた。

【0032】実施例2：ヒト培養癌細胞のHSP発現量の測定

(1) ヒト培養癌細胞の培養

ヒト神経腫瘍細胞株 (神経芽細胞腫) SK-N-MC (ATCC HTB 10) を、非必須アミノ酸 (L-アラニン8.9mg/l、L-アスパラギン・H₂O 15.0mg/l、L-アスパラギン酸13.3mg/l、L-グルタミン酸14.7mg/l、グリシン7.5mg/l、L-プロリン11.5mg/l 及びL-セリン10.5mg/l) 及び10%非働化FBSを含むMEM培地中で、5%二酸化炭素条件下で、熱ショック処理時以外は、37℃で培養した。

【0033】(2) アロイン処理及び熱ショック処理
播種2日後の前記神経腫瘍細胞株 (神経芽細胞腫) SK-N-MCの培地中に、最終濃度100μMになるように前記式 (II) で表されるアロイン (一丸ファルコス) を添加し、24時間培養した。その後、45℃にて15分間熱ショック処理をしてから、37℃にて終夜培養した。対照試験は、アロインを添加しないこと以外は前記と同様に実施した。

【0034】(3) ヒト培養癌細胞でのHSP発現量の測定

前項 (2) で処理した各細胞を、以下に示す方法によりホモジナイズし、HSP発現量をウェスタンブロット法にて測定した。すなわち、前項 (2) で処理した細胞を

PBS (一) で洗浄した後、ライシスバッファー (lysis buffer) [1.0% NP-40、0.15M塩化ナトリウム、50mMトリス-HCl (pH 8.0)、5mM-EDTA、2mM-N-エチルマレイミド、2mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、2μg/mlロイペプチン及び2μg/mlペプスタチン] 1mlを加え、氷上で20分間静置した。その後、4℃で12000rpmにて、20分間、遠心を行った。遠心後の上清10μlをPBS (一) 790μlに加え、更にプロテインアッセイ染色液 (Dye Reagent Concentrate: バイオラッド, カタログ番号500-0006) 200μlを加えた。5分間、室温にて静置した後、595nmで吸光度を測定してタンパク質定量を行った。タンパク質定量を行った試料を用いて、Laemmliのバッファー系にて、等量のタンパク質を含むライセートのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後、実施例1で述べた方法に従って、ブロッティング及びそれに続くブロッキングを行った。すなわち、タンパク質転写装置 (Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell: バイオ・ラッド) を用いて、室温にて100Vにて、0.45μmニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, カタログ番号401196) にゲルを密着させ、3時間ブロッティングを行った。ブロッティングバッファーとしては、前記実施例1 (3) で用いたバッファーと同じものを用いた。ブロッティング後、ニトロセルロース膜を10%スキムミルク (雪印乳業) - PBS (一) 溶液に室温にて30分間、インキュベートし非特異的結合をブロックした。

【0035】ブロッキング後、ニトロセルロース膜の上で、実施例1で製造した抗ヒトHSP 47ラットポリクローナル抗体により、1次抗体反応を行った。その後、PBS (一) で5分間ずつ、溶液を取り替えて2回の洗浄をスロー・ロッキング・シェイカーによって行い、更にPBS (一) - 0.1% Tween 20 (バイオ・ラッド, カタログ番号170-6531) 溶液で15分間ずつ、溶液を取り替えて4回の洗浄を行った。最終的に、PBS (一) で5分間ずつ、2回の洗浄を行った。洗浄終了後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットIgG抗体 (Southern Biotechnology, カタログ番号3030-05) を、2%スキムミルクを含むPBS (一) 溶液で5000倍に希釈して調製した抗体溶液5mlを用いて、2時間、2次抗体反応を行った。反応終了後、ニトロセルロース膜に関して、PBS (一) 溶液で5分間ずつ溶液を変えて2回、更にPBS (一) - 0.1% Tween 20溶液で15分間ずつ溶液を変えて5回の洗浄をスロー・ロッキング・シェイカーにより行った。最後にPBS (一) 溶液で5分間ずつ2回の洗浄を行った。余分なPBS (一) 溶液を除去した後、ウェスタンブロッティング検出試薬 (ECL Western blotting detection reagent; Amersham, カタログ番号RPN2106) をニトロセルロース膜上

に振りかけ、1 分間インキュベートした後、余分な検出試薬を除去し、ニトロセルロース膜をラップに包み、反応面を X 線フィルム (コダック X-OMAT, AR, カタログ番号 165 1454) に密着させて露光し、現像して HSP 47 の有無の検討を行った。

【0036】その結果、対照試験、すなわち、アロインを添加しなかった神経腫瘍細胞株 (神経芽細胞腫) SK-N-MC では、分子量約 47 kD のバンドが一本検出された。なお、分子量は、分子量マーカー (ウシカーボニックアンヒドラーゼ、卵白オバルブミン、及びウシ血清アルブミン) により決定した。アロインを添加した神経腫瘍細胞株 (神経芽細胞腫) SK-N-MC では、対照試験に比べて分子量約 47 kD のバンドの濃度が有意に薄くなった。すなわち、アロインは、HSP 47 の発現を抑制する合成抑制剤の活性を有するものと結論づけられ、この事実は、アロインが細胞外マトリックス産生の亢進に抑制的に働くことを示している。

【0037】

* 【発明の効果】以上詳述したように、本発明の合成抑制剤は、例えば、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全 (又は慢性腎不全に陥いる疾患)、心肥大、術後の癒痕や熱傷性癒痕、交通事故等の後に生じるケロイドや肥厚性癒痕、強皮症、動脈硬化、又は関節リウマチなどの細胞外マトリックス産生の亢進の病態を示す病気に罹患した細胞にみられるコラーゲン合成亢進を改善する作用を有する。従って、本発明による合成抑制剤を投与することにより、臓器、組織の線維化、硬化が阻止され、その結果、前記病気の患者の生理学的状態を有効に改善させ、前記病気を効果的に治療することができる。また、本発明の合成抑制剤は、血管新生の異常増殖を伴う各種疾患の予防治療にも有用である。更に、I 型コラーゲンとフィブロネクチンを基本骨格とする間質が、癌の転移において離脱した癌細胞が近傍の脈管に侵入するまでのガイド役を果たすことが、明らかとなっているので、本発明の合成抑制剤を投与することにより、癌の転移を抑制することも可能である。

*

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	ACV		A 6 1 K 31/70	ACV
	ADS			ADS
35/78	ABG		35/78	ABGV
	ADA			ADA
C 0 7 H 7/04			C 0 7 H 7/04	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)